

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-181820

(43)Date of publication of application : 26.06.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
// C07K 14/775
C07K 16/38
C12P 21/08

(21)Application number : 2000-380180

(71)Applicant : IKAGAKU:KK

(22)Date of filing : 14.12.2000

(72)Inventor : UCHIDA KAZUO
MASHIBA SHINICHI

(54) DIAGNOSIS KIT FOR DISEASE RESULTING FROM ARTERIOSCLEROSIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an excellent diagnosis kit for a disease resulting from arteriosclerosis.

SOLUTION: Taking denatured remnant lipoprotein (denatured IDL) resulting from denaturation of remnant lipoprotein (IDL) in blood and denatured low-density lipoprotein (denatured LDL: oxidized LDL is also included) resulting from denaturation of low-density lipoprotein in blood as subjects of measurement, measurement is carried out by using an antibody recognizing aldehyde formed in the denatured LDL, or an anti-4-hydroxy-2-nonalol antibody reactive with the oxidized LDL and a complex of oxidized LDL and protein, an anti-malonidialdehyde antibody, or an anti-acrolein antibody.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-181820

(P2002-181820A)

(43) 公開日 平成14年6月26日 (2002. 6. 26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード* (参考)

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

W 4 B 0 6 4

// C 0 7 K 14/775

C 0 7 K 14/775

4 H 0 4 5

16/38

16/38

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2000-380180(P2000-380180)

(71) 出願人 000141875

株式会社いかがく

京都府京都市伏見区羽東師古川町328番地

(22) 出願日 平成12年12月14日 (2000. 12. 14)

(72) 発明者 内田 孝夫

京都府京都市伏見区羽東師古川町328番地

株式会社いかがく内

(72) 発明者 真柴 新一

京都府京都市伏見区羽東師古川町328番地

株式会社いかがく内

(74) 代理人 100085316

弁理士 福島 三雄 (外 2 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動脈硬化性病変の診断用キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 動脈硬化性疾患のより優れた診断キットを提供する。

【解決手段】 血液中のレムナントリポ蛋白 (IDL) が変性されてなる変性レムナントリポ蛋白 (変性IDL) と血液中の低比重リポ蛋白 (LDL) が変性されてなる変性低比重リポ蛋白 (変性LDL: 酸化LDLを含む) とを測定対象とし、変性LDL中に形成されたアルデヒドを認識する抗体あるいは酸化LDL、及び、酸化LDLと蛋白の複合体に反応性を有する抗4ヒドロキシ2-ノネナール抗体、抗マロンジアルデヒド抗体、又は抗アクロレイン抗体を用いて測定する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血液中のレムナントリポ蛋白 (IDL) が変性されてなる変性レムナントリポ蛋白 (変性IDL) を測定対象にすることを特徴とする動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項2】 血液中の低比重リポ蛋白 (LDL) が変性されてなる変性低比重リポ蛋白 (変性LDL: 酸化LDLを含む) と、血液中のレムナントリポ蛋白 (IDL) が変性されてなる変性レムナントリポ蛋白 (変性IDL) とを測定対象にすることを特徴とする動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項3】 変性LDL中に形成されたアルデヒドを認識する抗体を用いる請求項1又は2に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項4】 抗4ヒドロキシ2-ノネナール抗体、抗マロンジアルデヒド抗体、又は抗アクロレイン抗体を用いる請求項1～3の何れかに記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項5】 酸化LDL、及び、酸化LDLと蛋白の複合体に反応性を有する抗4ヒドロキシ2-ノネナール抗体、抗マロンジアルデヒド抗体、又は抗アクロレイン抗体を用いる請求項1～4の何れかに記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項6】 前記蛋白は、 α 1アンチトリプシン、ラクトフェリン、フィブリノーゲン、ミエロペルオキシダーゼ、ヒトアルブミン、カゼイン、CRP、又はSAA1の何れか1つ以上である請求項5に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項7】 変性LDLや変性レムナントリポ蛋白などのヒト蛋白成分を特異的に認識しない動物由来の免疫グロブリン (IgG) を用いて、血液中の変性レムナントリポ蛋白を測定する請求項1又は請求項2に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項8】 酵素免疫法やラテックス凝集反応、免疫発光分析法、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用いることを特徴とする請求項1～請求項7の何れかに記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項9】 少なくとも、抗4ヒドロキシ2-ノネナール抗体と、酵素標識抗ヒトアポB 100抗体と、酵素測定用の試薬とを備え、免疫学的測定法によって血液中の変性LDL (酸化LDLを含む) と変性レムナントリポ蛋白を測定する請求項1～請求項8の何れかに記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血液中の変性LDL (酸化変性LDLを含む) と変性レムナントリポ蛋白を測定することにより動脈硬化性疾患を診断するキットに関するものである。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】 動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈および頭動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。また、最近ではアルツハイマー病も動脈硬化症と関連性の大きい疾患であることがわかってきた。従来、血液中で、これらの生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血清中あるいは血漿中のLDLコレステロール、Lp (a)、レムナントリポ蛋白、small dense LDLなど、LDLを主体とした血管壁脂質蓄積と関与の深い、動脈硬化性疾患に関わるリポ蛋白として測定されてきた。なかなか、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連がスタインバーグ (Steinberg, D. et al. *Engl. Med.* 320: 915, 1989) により、一方、Rossらが提唱した傷害反応仮説 (Ross, R. *Nature*. 362: 801, 1993) によって指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

【0003】 一方、最近の研究では、VLDLあるいはカイロミクロン代謝の中間体であるレムナントリポ蛋白が動脈硬化惹起性の強いリポ蛋白であることもわかってきた。レムナントリポ蛋白とは、小腸で生成される食事性脂肪を運搬するカイロミクロンや、肝で生成される内因性脂肪を運搬するVLDLなどの中性脂肪 (TG) richリポ蛋白が、血中でリポ蛋白リパーゼなどの酵素の働きによりリモデリングを受け、小型化した中間代謝物を指す。即ち、レムナントリポ蛋白は、カイロミクロンレムナントとVLDLレムナントを総称する呼び名であり、ともに、TGに富み、比較的高アポBとコレステロールに富むリポ蛋白である (多田紀夫、医学のあゆみ、181: 868, 1997)。

【0004】 上述の高TG血症が冠動脈疾患の危険因子であることを示した大規模疫学調査としては、冠動脈疾患のない対象では、Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study (1996年、ドイツ、対象は男4849例)、The Physician's Health Study (1996年、アメリカ、対象は5749例)、Copenhagen Male Study (1998年、デンマーク、対象は男子2906例)、冠動脈疾患の既にある対象では、The Baltimore Coronary Observation Long-Term Study (COLTS) (1998年、アメリカ、350例)、The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study (1999年、イスラエル、対象は11,532例) などが報告されている。

【0005】 高コレステロール血症に比べて、高TG血症の動脈硬化進展メカニズムについての研究が遅延した原因は、その多様性にあると考えられてきた。即ち、高TG血症の動脈硬化進展メカニズムに関連する要因は、高レムナント血症、低HDLコレステロール血症、small dense LDL、血液凝固線溶系異常、インスリン抵抗性など非常に多様である。このレムナントリポ蛋白は、TG richリポ蛋白であるため、その増加は血清TGの増加として捉えられるが、血清TG増加が必ずしもレムナント増加を意味するものではない。レムナントリポ蛋白の血中での増加

は、リポ蛋白電気泳動上、broad- β パターンの出現にて推測できるが、Lp(a)も泳動上この部位に泳動されるため、その鑑別は困難とされている(多田紀夫, 動脈硬化, 26:98, 1998)。また、このレムナントリポ蛋白によって動脈壁内腔中に運び込まれるコレステロール総量はLDLによるものより多いとされ(Gianturco S.H. 他, J. Clin. Invest. 82: 1633, 1988)さらに、レムナントリポ蛋白は変性を受けなくとも酸化LDLなどと同様にマクロファージに取り込まれ泡沫化を促進することから動脈硬化病変の形成に深く関与している。

【0006】この様な現状において、本発明者らは血液中に存在する変性LDL(酸化LDL)の検出法(特願平8-317162号, 特願平11-109001号, 特願平11-027913号, 特願2000-012210号, 特願平11-24440号)とともに、これら、酸化LDL同様に動脈硬化巣で形成され血中に移行し、流血中に存在することが予想される変性レムナントリポ蛋白の検出を明らかにしたうえで、新規な両者の検出方法を考案することにより、動脈硬化性疾患のより優れた診断法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】これまでの疫学的、実験的研究から、リポ蛋白の異常は動脈硬化の発症や進展に密接に関係することが明らかとなっている。LDLは酸化変性によりスカベンジャー受容体あるいはLD受容体を介してマクロファージに取り込まれ、その泡沫化を促進することが明らかにされている。

【0008】一方、レムナントリポ蛋白はLDLのごとく酸化変性しなくともマクロファージがレムナントリポ蛋白を認識する受容体(LDL受容体関連蛋白、膜結合蛋白200、膜結合蛋白235など)を介して取り込まれ、マクロファージは泡沫細胞となることが知られている。さらに、高レムナント血症においては、LDLが易酸化性の小型高密度型になっており(Small dense LDL)、このいずれもが血管壁のコレステロール蓄積の促進に作用するダブルヒットの状態となっている。

【0009】従って、動脈硬化病巣にはLDL(主にSmall dense LDL)およびレムナントリポ蛋白の両方の変性物が共存蓄積していることが予想される。さらにブラークの破綻とともに血液中にこれらの両成分が移行すると考えられるので、変性レムナントリポ蛋白が酸化LDLと同時にあわせて血液中で検出できれば、動脈硬化性病変を診断するうえで、より優れたマーカーになると考えた(図1)。

【0010】そして、さらなる研究を重ねた結果、レムナントリポ蛋白の特性を有し、かつ変性をともなうリポ蛋白と小型で高密度のLDLが変性してなる酸性変性LDLが血液中に相対して存在する事実を発見して本発明に至った。すなわち、本発明に係る動脈硬化性病変の診断用キットは、血液中のレムナントリポ蛋白(IDL)が変性されてなる変性レムナントリポ蛋白(変性IDL)を測定

対象にする。また、血液中の低比重リポ蛋白(LDL)が変性されてなる変性低比重リポ蛋白(変性LDL: 酸化LDLを含む)と、血液中のレムナントリポ蛋白(IDL)が変性されてなる変性レムナントリポ蛋白(変性IDL)とを測定対象にする。なお、具体的には、血液中の酸化変性LDLと変性レムナントリポ蛋白を同時に、又は、それぞれ分別測定することによって動脈硬化性疾患の診断を行うものである。

【0011】本発明では、変性LDL中に形成されたアルデヒドを認識する抗体を用いることが好ましい。また、抗4ヒドロキシノネナール抗体、抗マロンジアルデヒド抗体、又は抗クロレイン抗体を用いることが好ましく、より好適には、酸化LDL、及び、酸化LDLと蛋白の複合体に反応性を有する抗4ヒドロキシノネナール抗体、抗マロンジアルデヒド抗体、又は抗クロレイン抗体を用いると良い。ここで、前記蛋白は、 α 1アンチリブリン、ラクトフェリン、フィブリノーゲン、ミネロペルオキシダーゼ、ヒトアルブミン、カゼイン、CRP、又はSAAGの何れか1つ以上であり、その全ての蛋白との複合体に反応性を有する抗体が望ましい。

【0012】また、変性LDLや変性レムナントリポ蛋白などのヒト蛋白成分を特異的に認識しない動物由来の免疫グロブリン(IgG)を用いて、血液中の変性レムナントリポ蛋白を測定するのも好適である。

【0013】

【実施例】以下、本発明について具体的に説明する。

【1.】酸化LDL高価血清中のLDLの粒子サイズ
本発明者らが先に発明した血液中の酸化LDL測定法(特願平8-317162号)で酸化LDLが高価を示した血清中のLDL粒子サイズを測定したところ図2に示すごとく、全例においてLDLの小粒子化が認められた。また、アガロース電気泳動上で、小粒子LDLは陰性帯電が増し、陽性側に泳動された(図3)。

【0014】【2.】酸化LDLの粒子サイズ
本発明者らが先に発明した血液中における酸化LDLの存在様式(特願2000-012210)にもとづいて超遠心法で分離したLDLから単離精製した酸化LDLの粒子サイズを検討した結果、いずれの酸化LDLも小粒子傾向であった(図4)。

【0015】【3.】酸化LDL中に共存するレムナントリポ蛋白の確認
8例の血清から得たLDL画分中の酸化LDLを単離精製後、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動したところ、酸化LDLが小粒子であることが確認されるとともにレムナントリポ蛋白が共存していることがわかった(図5)。

【0016】【4.】酸化LDL中に存在するIgG結合性リポ蛋白の確認
酸化LDL(α 1アンチリブリン/LDL複合体)の α 1アンチリブリンを特異的に認識するモノクローナル抗体 α x

5

AT-4固定化Affinity担体とヒト成分には特異性を示さない70k抗体(マウスグロブリン)固定化Affinity担体を用いて超遠心法で分離したLDLに反応させた後、それぞれの担体によって単離できる成分(酸化LDLとIg結合性リポ蛋白)についてOxAT抗体とapoB 100抗体染色した。その結果、図6に示すごとく、70k抗体のみに反応性を示すapo B100成分の存在を認めた(Ig結合性リポ蛋白)。

【0017】[5.] 正脂血LDL画分中に存在するIg結合性リポ蛋白の単離精製とその性質(1) 超遠心法で分離したLDLをヒト成分と反応しない抗体(抗馬フェリチン抗体:ウサギIgG)固定化Affinityカラムに通し、Ig結合性リポ蛋白を単離した。その特長は、apoB100の断片化は酸化LDLとほぼ同等であるが、酸化LDL中には存在するアルデヒド(4ヒドロキシ2-ノネナル)は認められなかった(図7)。

【0018】[6.] 高脂血症LDL画分中に存在するIg結合性リポ蛋白の単離精製とその性質(2) 上述と同様に高脂血症患者のLDLからIg結合性リポ蛋白を単離後、apoB 100の断片化状態、およびサイズを調べたところ、apoB 100の断片化は酸化LDLと同程度であった。また、ゲル濾過分析法によって粒子サイズを調べたところ、ほぼIDL(レムナントリポ蛋白)と同サイズであった(図8)。

【0019】[7.] AT/LDL複合体(酸化LDL)および、Ig結合性LDL中のapoEの確認 上述のごとく、LDL画分中から単離精製したIg結合性リポ蛋白中のアポ蛋白Eの存在を確認したところ、Ig結合性リポ蛋白はアポEを有することがわかった(図9)。従って、Ig結合性リポ蛋白はレムナントリポ蛋白(変性レムナントリポ蛋白)であることがわかった。

【0020】[8.] 各種アルデヒド抗体の作製 [抗原の調整] 本発明に用いる各種アルデヒド抗体は以下のようにして作製された。抗原の調整は4ヒドロキシ2-ノネナル、又は、マロニアルデヒド、又は、アクリロインの5mg/ml溶液と同一濃度の α 1アンチトリプシン(α 1AT)液をそれぞれ常温下で混和して、4ヒドロキシ2-ノネナルと α 1ATの結合体、又は、マロニアルデヒドと α 1ATの結合体、又は、アクリロインと α 1ATの結合体を形成させた後、それぞれの結合体を脱塩カラム処理によって遊離のアルデヒドを除去した。

【0021】[動物への免疫] これらの結合体(抗原)をリン酸緩衝生理食塩液でそれぞれ α 1AT濃度として1mg/ml溶液となるように調整し、この溶液とフロインドアジュバントを等量混合して得られるエマルジョンをアルデヒドの種類別に準備した6週齢のマウス(Balb/c系マウス)の腹腔内にそれぞれ500 μ l投与した。この作業を2週間おきに計行なった。

【0022】[細胞融合] 最終免疫後4日目にそれぞれのマウスの脾臓から採取した脾リンパ球細胞をマウス骨

6

髄腫細胞(P3-X63-Ag8-U1)と融合させた。融合は常法に従い、50%ポリエチレングリコール4000溶液を融合促進剤として用い、融合促進剤の添加、混合および希釈の各操作からなる融合時間を10分間、37°Cで行った。次にHAT培地に融合終了後の融合細胞を分散させ、次いで各アルデヒド/ α 1AT結合体ごとに10⁶の96穴マイクロプレートに各ウェルに200 μ l分注し、37°C、5%炭酸ガス存在下で培養した。

【0023】[抗4ヒドロキシ2-ノネナル/ α 1ATモノクローナル抗体、又は、抗マロニアルデヒド/ α 1ATモノクローナル抗体、又は、アクリロイン/ α 1ATモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ選択および単一化] 約1週間後、各ウェルのHAT培地を100 μ l吸出し、HAT培地(ヒポキサンチン・チミジン・10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地)を各ウェルに分注し、2~3日後、各アルデヒド別に抗体産生ハイブリドーマの選択を行った。

【0024】選択方法は、4ヒドロキシ2-ノネナル結合 α 1ATに対する抗体については4ヒドロキシ2-ノネナル結合 α 1AT、酸化LDL、酸化LDL/ α 1AT、酸化LDL/ラクトフェリン、酸化LDL/フィブリノーゲン、酸化LDL/ミエロペルオキシダーゼ、酸化LDL/ヒトアルブミン、酸化/カゼイン、酸化LDL/SAA複合体を各々固定化した96穴マイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマ形成コロニーの培養上清を100 μ l分注して反応させ、次いで、洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を100 μ l添加して、抗原抗体反応させ、洗浄、呈色とELISAの常法に従って操作し、目的とする抗体(抗原および酸化LDLおよび各種蛋白/LDL複合体のできるだけ多様と反応性を示すが、 α 1ATには反応しない抗体)産生ハイブリドーマを複数個選択した。マロニアルデヒドおよびアクリロイン抗体産生ハイブリドーマの選択についても上述の4ヒドロキシ2-ノネナルと同様に行った。

【0025】次に目的とする抗体産生を示したコロニーを回収し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一コロニーを得るようクロニングを行った。この方法は、回収したコロニーをHAT培地で希釈し、96穴マイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマが分散当たり1個以下となるようにフィーダー細胞と共に数付した。以上の操作を2回行い、モノクローン化された、抗4ヒドロキシ2-ノネナル/ α 1AT抗体、又は、抗マロニアルデヒド/ α 1AT抗体、又は、抗アクリロイン/ α 1AT抗体産生ハイブリドーマを各複数個得た。

【0026】[各アルデヒド/ α 1AT抗体の腹水化] 8週齢のマウス(Balb/c系マウス)の腹腔内にブリスラン(免疫抑制剤)を投与した。3~7日後に複数個の抗体産生ハイブリドーマを各ハイブリドーマごとに準備したマウスの腹腔内に投与し、約7日後にマウスの腹腔から腹水化された抗体を回収した。

【0027】[抗体の精製] 腹水化して得られたそれぞれ

50

れの抗体を50%硫酸アンモニウムで2回塩析分離を行い、リン酸緩衝生理食塩水にて透析して精製し、各種アルデヒドごとに複数個のモノクローナル抗体を得た。

【0028】[9.] 酸化LDL中の各種アルデヒド存在の証明

高脂血症LDL画分から単離精製した各種酸化LDL中のアルデヒド(4ヒドロキシノネナル、マロンジアルデヒド、アクロレイン)を各種抗アルデヒド抗体を用いて検討した結果、酸化LDL中にはアルデヒドの存在が認められた(図10)。

【0029】[10.] 血清中酸化LDLの測定法

[抗体]

1. 抗4ヒドロキシノネナルモノクローナル抗体

2. 抗ヒト apo B-427モノクローナル抗体

【0030】[使用試薬]

1. 30mM CHAPS溶液

CHAPSを0.5%BSA 0.15M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解する。

2. 5%スキムミルク溶液

スキムミルクを0.65M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解する。(ブロッキングに5%スキムミルクを用いることにより変性レムナントリボ蛋白のIgGへの結合を防ぐ)

3. 1%カゼイン溶液

ミルクカゼインを0.15M NaCl 含有0.1M Tris水溶液で溶解した後、塩酸でpH8.0に調整する。

【0031】4. 0.05%Tween20溶液

Tween20を0.01Mリン酸生理食塩水(PBS)に溶解する。

5. 発色試薬

TMBZ(同仁化学)40mgをメタノール50mlで溶解した後、0.1M Tris水溶液50mlを混合し、TMBZ溶液100mlを調整する。また、0.0375%過酸化水素水を含む0.035Mクエン酸水溶液を調整する(用時調整)。使用時に両試薬を等量混合し、発色試薬とする。

6. 1Mリン酸水溶液

7. ビオチン標識Fab' 化抗ヒト apoB-427モノクローナル抗体

石川らのhinge法を参考に、ビオチンマレイミド(Vector Laboratories社製)をFab' 化抗ヒト apoB-427モノクローナル抗体に標識する。

【0032】[測定手順]

1. 抗4ヒドロキシノネナル(HNE)モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に5μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。

3. 55μg/ml Mouse Gamma GlobulinとRabbit Gamma Globulinを含む5%スキムミルク溶液をHNE抗体固相マイクロプレートに100μl/well分注し、これに30mM CHAPS溶

液で10倍希釈した血清を50μl添加する。

【0033】4. 室温下、1時間反応させる。

5. 0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab' 化抗ヒト apoB-427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で3000倍に希釈し100μl/well分注する。

7. 室温下、1時間反応させる。

8. 5.と同様、0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

10. 【0034】9. HRP標識アビジンD(Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で20000倍希釈とし、100μl/well分注する。

10. 室温下、30分間反応させる。

11. 5.と同様、0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100μl/well分注し、室温下20分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測定する。

15. 検算線から血清中の酸化LDL濃度を計算する。

【0035】[11.] 血清中の変性レムナントリボ蛋白測定法

[抗体]

1. 抗Horse Ferritinモノクローナル抗体(IgG結合性リボ蛋白:変性レムナントリボ蛋白測定にはヒト成分に反応性を示さない抗Horse Ferritin抗体を用いる)

2. 抗ヒト apo B-427モノクローナル抗体

【0036】[使用試薬]

1. 30mM CHAPS溶液

CHAPSを0.5%BSA 0.15M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解する。

2. 1%BSA溶液

BSAを0.15M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解する。

3. 1%カゼイン溶液

ミルクカゼインを0.15M NaCl 含有0.1M Tris水溶液で溶解した後、塩酸でpH8.0に調整する。

4. 0.05%Tween20溶液

40 Tween20を0.01Mリン酸生理食塩水(PBS)に溶解する。

【0037】5. 発色試薬

TMBZ(同仁化学)40mgをメタノール50mlで溶解した後、0.1M Tris水溶液50mlを混合し、TMBZ溶液100mlを調整する。また、0.0375%過酸化水素水を含む0.035Mクエン酸水溶液を調整する(用時調整)。使用時に両試薬を等量混合し、発色試薬とする。

6. 1Mリン酸水溶液

7. ビオチン標識Fab' 化抗ヒト apoB-427モノクローナル抗体

50 石川らのhinge法を参考に、ビオチンマレイミド(Vector

r Laboratories社製)をFab⁺化抗ヒトapoB-427モノクローナル抗体に標識する。

【0038】〔測定手順〕

1. 抗Horse Ferritin⁺リクローナル抗体を0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH8.0緩衝液に5μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。

3. 55μg/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulinを含む1%BSA溶液を抗Horse Ferritin抗体固相マイクロプレートに100μl/well分注し、これに30mM CHAPS溶液で10倍希釈した血清を50μl添加する。

4. 室温下、1時間反応させる。

【0039】5. 0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab⁺化抗ヒトapoB-427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で3000倍に希釈し100μl/well分注する。

7. 室温下、1時間反応させる。

8. 5.と同様、0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で2000倍希釈とし、100μl/well分注する。

10. 室温下、30分間反応させる。

【0040】11. 5.と同様、0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100μl/well分注し、室温下20分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 検量線から血清中の変性レムナントリポ蛋白濃度を算出する。

【0041】〔12.〕血清中の酸化LDLおよび変性レムナントリポ蛋白の同時測定法

〔抗体〕

1. 抗ヒドロキシ2-ノネナールモノクローナル抗体 (HNE抗体)

2. 抗ヒト apo B-427モノクローナル抗体

【0042】〔使用試薬〕

1. 30mM CHAPS溶液

CHAPSを0.5%BSA 0.15M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解する。

2. 1%BSA溶液

BSAを0.15M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解する。(ブロッキングを1%BSAで行うことにより、IgG結合性リポ蛋白:変性レムナントリポ蛋白はFc部位に結合できる)

3. 1%カゼイン溶液

ミルクカゼインを0.15M NaCl含有0.1M Tris水溶液で溶解した後、塩酸でpH8.0に調整する。

4. 0.05%Tween20溶液

Tween20を0.02Mリン酸生理食塩水(PBS)に溶解する。

【0043】5. 発色試薬

TMBZ (同仁化学) 40mgをメタノール50mlで溶解した後、0.1M Tris水溶液50mlを混合し、TMBZ溶液100mlを調整する。また、0.0375%過酸化水素水を含む0.03Mクエン酸水溶液を調整する(用時調整)。使用時に両試薬を等量混合し、発色試薬とする。

6. 1Mリン酸水溶液

7. ビオチン標識Fab⁺化抗ヒトapoB-427モノクローナル抗体

石川らのhinge法を参考に、ビオチンマレイミド (Vector Laboratories社製)をFab⁺化抗ヒトapoB-427モノクローナル抗体に標識する。

【0044】〔測定手順〕

1. 抗HNEモノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH8.0緩衝液に5μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。

3. 55μg/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulinを含む1%BSA溶液をHNE抗体固相マイクロプレートに100μl/well分注し、これに30mM CHAPS溶液で10倍希釈した血清を50μl添加する。

4. 室温下、1時間反応させる。

【0045】5. 0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab⁺化抗ヒトapoB-427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で3000倍に希釈し100μl/well分注する。

7. 室温下、1時間反応させる。

8. 5.と同様、0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

【0046】9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で2000倍希釈とし、100μl/well分注する。

10. 室温下、30分間反応させる。

11. 5.と同様、0.05%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100μl/well分注し、室温下20分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 検量線より血清中の酸化LDL、変性レムナントリポ蛋白濃度を算出する。

【0047】〔13.〕酸化LDLおよび変性レムナントリポ蛋白濃度と血清脂質との関係

血清中のレムナトリポ蛋白濃度を正確に測定する方法は確立されていない。一般的にレムナトリポ蛋白が増加した状態では、高コレステロール血症と高トリグリセリド血症の両者を呈することが知られている。これらの症例について酸化LDLおよび変性レムナトリポ蛋白を測定した結果、レムナトリポ蛋白が増加した状態の被検者の一部に酸化LDL、変性レムナトリポ蛋白の増加が認められ、動脈硬化症の進展をうかがわせる症例の存在が示唆された(図11,12)。

【図面の簡単な説明】

【図1】 血中には酸化LDLと変性レムナントが存在する仮説を説明する図面である。

【図2】 AT/LDL複合体高値血清中のLDLの粒子サイズを示す図面である。

【図3】 LDLの粒子サイズと荷電の関係性を示す図面である。

【図4】 各種蛋白/LDL複合体の粒子サイズを示す図面である。

*【図5】 酸化LDL中に存在するレムナトリポ蛋白を示す図面である。

【図6】 LDL画分中に存在するIgG結合性リポ蛋白を示す図面である。

【図7】 正脂血LDL画分中に存在するIgG結合性リポ蛋白の特性を示す図面である。

【図8】 高脂血症LDL画分中に存在するIgG結合性リポ蛋白の特性を示す図面である。

10 【図9】 AT-LDL複合体(酸化LDL)中にapoEは認められないがIgG結合性リポ蛋白中にはapoEを認めたことを示す図面である。

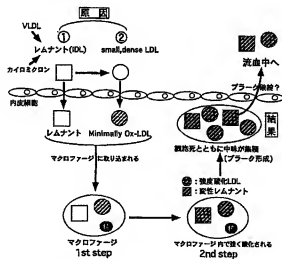
【図10】 各種蛋白/LDL複合体中のアルデヒドを証明する図面である。

【図11】 酸化LDLと血清脂質との関係を示したものである。

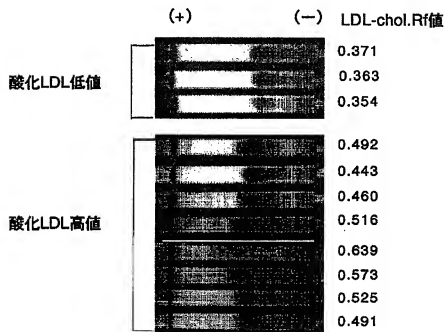
【図12】 変性レムナトリポ蛋白と血清脂質との関係を示したものである。

【図1】

血中には酸化LDL [4-hydroxy 2-nonenal(HNE) や malondialdehyde(MDA)等のアルデヒドを含有する] と、変性レムナント(HNE, MDAを含有しない)が存在する (仮説)



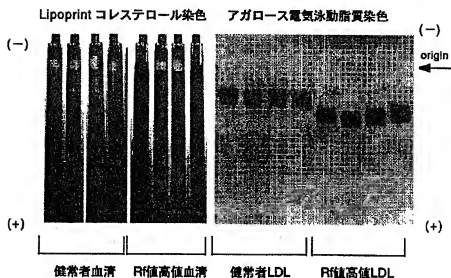
【図2】

AT/LDL複合体（酸化LDL）高値血清中の
LDLの粒子サイズ

Lipoprint LDL system

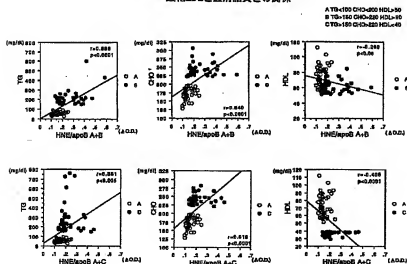
【図3】

LDLの粒子サイズと荷電の関係性



【図11】

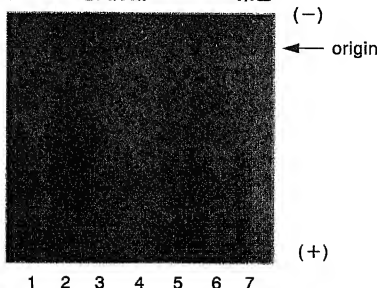
酸化LDLと血清脂質との関係



【図4】

各種蛋白/LDL複合体（酸化LDL）の 粒子サイズ

アガロース電気泳動Fat Red 7B染色

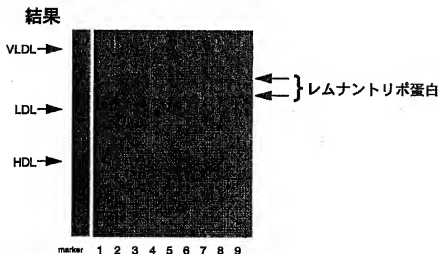


各LDLのChol.濃度/apo B濃度

1:native LDL	1.674
2:MPO/LDL	1.102
3:AT/LDL	1.215
4:Fib/LDL	1.075
5:SAA/LDL	1.262
6:CRP/LDL	1.367
7: α 2MG/LDL	1.258

【図5】

酸化LDL中に共存する レムナントリボ蛋白の確認



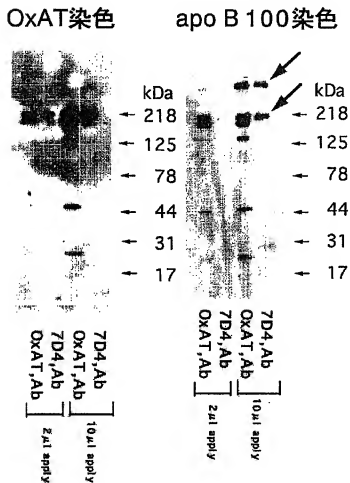
- 1 : 酸化LDL-AT複合体除去LDL
2~9 : 酸化LDL-AT複合体

方法

酸化LDL-AT複合体除去LDL（プール）とアフィニティー精製により得られた8例の酸化LDL-AT複合体試料を2%~15%ポリアクリルアミドゲル（マルチゲルーリボ、第一化学）を用いて2時間、25mAの定電流で泳動した。泳動終了後、添付のズダンブラックBによる脂質染色を12時間行い、染色後40%メタノール、10%エチレンジコールで脱色した。

【図6】

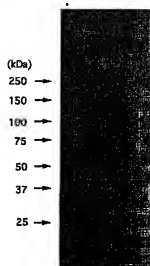
LDL画分中に存在するIgG結合性リポ蛋白



【図7】

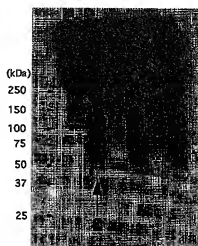
正脂血LDL画分中に存在する IgG結合性リポ蛋白の特性(1)

4ヒドロキシ2-ノネナル染色



1# T-LDL: IgG結合性リポ蛋白
2# OxAT-LDL
3# NEAT-LDL

apo B 100染色



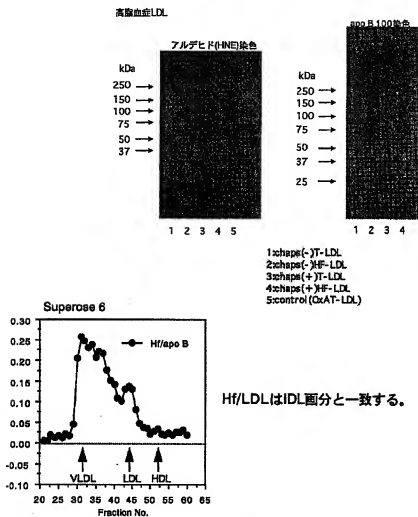
1# T-LDL
2# T-LDL: IgG結合性リポ蛋白
3# OxAT T-LDL
4# OxAT-LDL
5# NEAT T-LDL
6# NEAT-LDL

SDS-PAGE
非還元

特徴: apo B 100の断片化はAT/LDL複合体(酸化LDL)とほぼ同等。
アルデヒド(4ヒドロキシ2-ノネナル)の存在を認めない。

〔図8〕

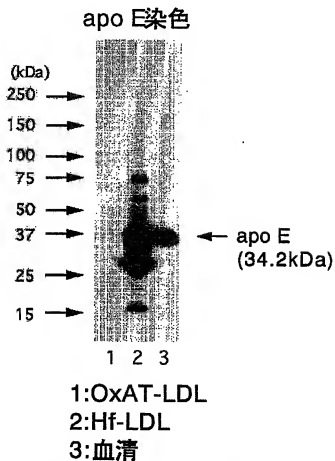
高脂血症LDL画分中に存在する IgG結合性リポ蛋白の特性(2)



- 特徴：
- ・ apo B 100の断片化はAT/LDL複合体（酸化LDL）とほぼ同等に断片化している。
 - ・ HINEの存在を認めない。
 - ・ IDLのサイズである。

【図9】

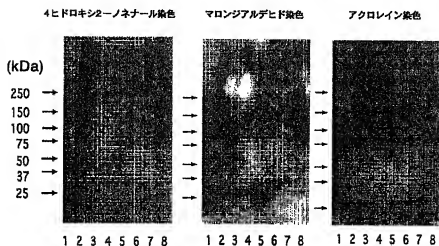
AT-LDL複合体（酸化LDL）,IgG結合性
リポ蛋白中のapo Eの確認



AT-LDL複合体（酸化LDL）中にapo Eは認められないが
IgG結合性リポ蛋白中にはapo Eを認めた。

【図10】

各種蛋白/LDL複合体（酸化LDL）中の アルデヒドの証明

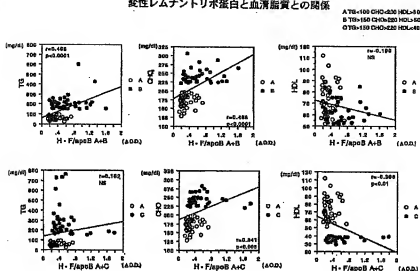


(非還元)

- 1:精製前高脂血症LDL
- 2:OxAT/LDL
- 3:Lf/LDL
- 4:Fib/LDL
- 5:SAA1/LDL
- 6:CRP/LDL
- 7:MPO/LDL
- 8:HNE/LDL

【図12】

急性レムナントリボ蛋白と血清脂質との関係



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE04
 CE06 DA13
 4H045 AA30 BA55 CA42 DA76 DA86
 EA50 FA72 GA06 GA26